

酶性 DNA: 人胚组织 DNA 酯酶活性的初步研究

陈嘉勤 禹宽平 王身立 陈佳俭^①

(湖南师范大学生物学系, 长沙 410081)

Deoxyribozyme Esterase Activity of DNA from Embryo Fissure of Human

CHEN Jia-Qin^①, YU Kuan-Ping^①, WANG Shen-Li^① and CHEN Jia-Jian^②^① Department of Biochemistry, Hunan Normal University, Changsha, 410081. ^② The First Hospital of Shaoyang, Hunan 422000, China)

ABSTRACT DNA which extracted from embryo tissue of human exhibited esterase activity. The experimental results suggested that α -naphthyl or β -naphthyl acetate could be decomposed by the DNA and then fast blue RR salt be led to appear special violet colour.

KEY WORDS Deoxyribozyme; DNA; Esterase; Embryo tissue of human;

摘要 人胚组织基因组 DNA 具有酯酶活性, 且具有热稳定性。

关键词 酶性 DNA; 酯酶; 人胚组织

美国生物化学家 J. B. Sumner 在 1926 年首次纯化出结晶脲酶, 证明酶的化学本质为蛋白质。这是人类对酶的化学本质认识的第一次飞跃。二十年后(1946 年) J. B. Sumner 荣获诺贝尔化学奖。八十年代初, 又发现 RNA 也具有酶活性。1981 年, T. R. Cech 证明原生动物四膜虫的 rRNA 具有自催化剪切的酶活性。1983 年, S. Altman 又报道大肠杆菌中的 RNase P 的 RNA 部分具有酶活性。这是人类对酶的化学本质认识的第二次飞跃。T. R. Cech 和 S. Altman 荣获 1989 年诺贝尔化学奖^[1,2]。

1995 年, 王身立、陈嘉勤、禹宽平三人首次证明高等植物绿豆幼苗中提取的 DNA 具有酯酶活性^[3,4], 随后王身立发现蜘蛛 DNA 能导致乙酸萘酯(包括 α -和 β -乙酸萘酯)和坚牢蓝溶液产生呈色反应。颜青山发现小牛胸腺 DNA 也能导致上述溶液显色, 且发现 100℃ 下加热一小时后的小牛胸腺 DNA, 无论是缓慢冷却或低温下骤然冷却, 均能导致上述溶液显色。以上结构提示: 蜘蛛 DNA 和小牛胸腺 DNA (无论是单链或双链状态) 均具有酯酶活性。嗣后, 李敏等作了进一步的实验研究^[5]。接着, 禹宽平, 陈嘉勤又分别报道鱼精及鸡 DNA 均具有酯酶活性(待发表)。

酶性 DNA 的发现, 提示 DNA 可能是最早起源的生命物质(早于蛋白质和 RNA), 这对人类关于生命起源的认识, 也是一次重要进展。

本文报道人类胚胎组织基因组 DNA 也具有酯酶活性。

1 材料与方法

1.1 提取人胚胎组织的基因组 DNA

人胚组织由邵阳市第一人民医院妇产科提供。新鲜的人胚组织 1~3 g, 按 Blin 和 Stafford^[6]所述略加改进的方法从中提取 DNA。每次实验从约 2 g 的新鲜人胚组织中可得到约 330 μ g DNA (大片段) 及 130 μ g DNA (小片段)。DNA 大片段的提取为: DNA 提取液经三次 Tris 饱和酚及二次氯仿: 异戊醇(24:1)抽提后, 再加 1/10 体积 3 mol \cdot L⁻¹ NaAc (pH 5.2) 及 2 倍体积冷无水乙醇沉淀。用大口径吸头吸取纤维状白色 DNA 沉淀。该沉淀用 70% 乙醇洗涤 2 次, 冷冻干燥, 适量灭菌双蒸馏水溶解, 即为 DNA 大片段。挑取大片段 DNA 后的离心管内碎片状的 DNA, 经 70% 乙醇洗涤干燥后即制得的小片段 DNA。用日产 HITACHI U-2000 型紫外可见分光光度计检测其纯度: OD_{260/280} 为 1.8 (大片

①邵阳市第一人民医院, 湖南 422000

段), $OD_{250/280}$ 为 1.9~2.0(小片段), 均符合实验要求。

1.2 酯酶活性测定

酯酶染色液的配方按文献[4]。显色反应后, 用岛津分光光度计扫描及测 OD 值, 以测知酯酶的相对活性。

1.3 酶解反应产物的增溶

酯酶染色液的配方中含有 α -或 β -萘酯及坚牢蓝。加入 DNA 样品后, 若 DNA 样品含量较高($\geq 80 \mu\text{g}$)或 DNase I 加量较多($\geq 10 \mu\text{g}$), 则酯解反应产物出现混浊。须经过离心后, 方能进行分光光度测定。但离心下来的颗粒吸附一定量的色素, 势必造成测定结果的偏差。本实验在加入酯酶染色液前, 先加入较高浓度的阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠作为增溶剂, 从而阻止了沉淀的形成, 得到了较为准确的测定结果。

1.4 DNase 处理

所用的 DNA 酶为 DNase I, 酶液浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 酶解管内含 DNA 10~20 μg , 加入 4~5 μg DNase I 及 1/10 反应体积的 $10\times$ 反应缓冲液 ($0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 7.5- $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2) 每管溶液总体积为 200~400 μl , 37°C 水浴反应 3 h, 反应后再加酯酶染色液 1.2 ml。

2 结果与讨论

2.1 DNA 的酯酶活性及对底物的相对选择性

浓度为 $83 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DNA 溶液 0.4 ml, 加 β -萘酯—坚牢蓝液 1.2 ml (反应总体积 1.6 ml), 37°C 反应 3 小时后, 测得溶液在 540 nm 处有明显吸收峰, $OD_{540 \text{ nm}} = 1.374$ (肉眼观为明显红棕色)。试剂对照管, 双蒸水 0.4 ml, 加 1.2 ml β -萘酯—坚牢蓝染色液, $OD_{540 \text{ nm}} = 0.098$ 。同上条件, 加 α -萘酯—坚牢蓝液 1.2 ml, $OD_{540 \text{ nm}} = 1.139$ (肉眼观为紫棕色)。以上实验提示人胚组织基因组 DNA 具有催化 α -和 β -萘酯的酯酶活性, 且对 β -萘酯的催化活性大于 α -萘酯。

2.2 DNase I 的作用

人胚组织基因组 DNA 溶液(大片段) 0.2 ml (含 DNA 17 μg), 或小片段 DNA 溶液 0.4 ml (含 DNA 14 μg), 各加 DNA 溶液体积 1/10 体积的 $10\times$ 反应缓冲液及 DNase I 5 μl , 37°C 水浴 3 小时, 再加 β -或 α -萘酯染色液 1.4 ml,

均不再出现特征性呈色反应(棕红色或紫棕色), 但将 DNA 含量加大至 $\geq 80 \mu\text{g}$, 而 DNase I 不加大浓度, 则出现 DNA 消化不完全现象, 可与萘酯染色液出现较淡的特征性呈色反应 (Table 1)。

Table 1. Action of DNase I

Feature of DNA	big fragment (content 17 μg)		small fragment (content 14 μg)	
content of DNase I (μg)	5	0	5	0
$OD_{540 \text{ nm}}$ (β -naphthyl acetate)	0.398	1.374	0.224	1.204

人胚组织基因组 DNA 经 DNase I 消化后, 基本上丧失酯酶活性, 为人胚组织基因组 DNA 具有酯酶活性提供了佐证。

2.3 DNA 酯酶活性的热稳定性

经 100°C 水浴处理一小时后(应足以使蛋白质变性)的 DNA 溶液, 再分别进行以下两种处理, 即缓慢冷却使 DNA 变性或 -20°C 骤冷使 DNA 保持为变性的单链状态。以上两种处理的 DNA, 再用 β -萘酯酯酶染色液检测其酯酶活性, 结果见 Table 2。

Table 2 所示结果说明, DNA 的酯酶活性具有热稳定性。无论是加热后变性的或保持单链状态的 DNA, 均仍然保持有明显的酯酶活性。且单链状态的 DNA 酯酶活性略大于双链状态的 DNA。

2.4 对蛋白酶 K 的实验

人胚组织基因组 DNA 抽提实验中, 用到较大的蛋白酶 K 消化蛋白质, 而单独用蛋白酶 K 做实验时, 发现蛋白酶 K 也具有酯酶活性。因此, 实验中用蛋白酶 K 做对照, 将 DNA 抽提过程中所用同样量的蛋白酶 K 与 DNA 抽提过程同样进行多次饱和酚、氯仿抽提, 乙醇洗涤, 沉淀。经过上述处理的蛋白酶 K 管中, 不再出现酯酶活性。表明 DNA 提取过程中, 用到蛋白酶 K 对 DNA 的酯酶活性的影响可以排除。

Table 2. Stability to heat of esterase activity by DNA ($OD_{540\text{ nm}}$).

treatment		measurement value	base value	masurement value — base value
β -naphtyl acetate	control	1.379	0.098	1.281
	renaturation	0.738	0.098	0.640
	single chain	0.783	0.098	0.685
α -naphtyl acetate	control	1.204	0.030	1.174
	renaturation	0.520	0.030	0.490
	single chain	0.587	0.030	0.557

参考文献

- Cech TR. Self-splicing and enzymatic activity of an intervening sequence RNA from tetra-hymena (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*, 1990, **29**: 759.
- Altman S. Enzymatic cleavage of RNA by RNA (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Eng*, 1990, **29**: 749.
- 王身立, 陈嘉勤, 禹宽平. 发现酶性 DNA. 湖南师范大学自然科学学报, 1995, (2): 53.
- 王身立, 陈嘉勤, 禹宽平, et al. 酶性 DNA(I)-发现绿豆 DNA 具有酯酶活性. 湖南师范大学自然科学学报, 1995, (3): 59~62.
- 李敏, 王身立, 禹宽平, et al. 酶性 DNA(II)-蜘蛛和小牛胸腺 DNA 具有酯酶活性. 湖南师范大学自然科学学报, 1995, (3): 63~65.

(本文 1995-11-01 收到)